

# 唾液腺腫瘍の増殖に対する癌抑制遺伝子と細胞周期調節因子の影響に関する研究

松 尾 敬 士

## Study on Effects of Tumor Suppressor Genes and Cell-Cycle Regulators on Proliferation of Salivary Gland Tumors

Keishi Matsuo

(平成11年1月21日受付)

### 諸 言

口腔腫瘍のなかで特異的な組織像を示すものに、歯原性腫瘍や唾液腺腫瘍がある。唾液腺腫瘍に、他の腺組織にはみられない複雑で特異的な組織構造を示す腫瘍が多いのは、唾液腺の腺房や介在部導管に存在する筋上皮細胞 (myoepithelial cell) が、著明な形態修飾に働く結果と考えられる<sup>1,2)</sup>。筋上皮の存在する涙腺、汗腺、食道や気管支の粘膜、時には乳腺にも、唾液腺腫瘍と同様か、または類似の組織像を呈する腫瘍の発生することがあるが<sup>2)</sup>、特異な組織像を呈するため、どの細胞が起源細胞であるのか、また特徴ある腫瘍基質はどの細胞に由来して形成されるのかなどの点に多くの議論がなされている。一般に、多形性腺腫や腺様嚢胞癌には、腫瘍性筋上皮が関与し介在部導管から発生するとされ、一方、粘表皮癌は排泄管上皮に由来する説が有力視されている。例えば、多形性腺腫より樹立された培養細胞株の多くは、筋上皮細胞としての性質を示すことが知られている<sup>3)</sup>。

一方、癌細胞の増殖機構の解明のため、癌抑制遺伝子や細胞周期調節因子に関する研究が盛んに行われ、野生型 p53 により誘導されて発現する p21 や p16 は細胞周期を負に調節していると考えられている。大腸癌をはじめさまざまな腫瘍の発生や進展の過程には、p53 が強く関与しており<sup>4,5)</sup>、p21<sup>6,7)</sup> や p16<sup>8)</sup> も、腫瘍の種類によっては異常に発現することが明らかにされてい

る。また、細胞周期は、サイクリン、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase, CDK)、さらに CDK インヒビターによって調節され、哺乳動物の G1 期にはサイクリン D と E が深く関与することが知られている<sup>9,10)</sup>。サイクリン D 遺伝子は、G<sub>1</sub> 期細胞の核内に発現し、Rb 遺伝子の不活化を介して S 期への進行を促進するとされ<sup>11,12)</sup>、頭頸部腫瘍や食道癌で特に高頻度に認められており、癌の発生、増殖および進展に関与することが判明しつつある<sup>13,14)</sup>。サイクリン E についても、癌細胞で発現率が上昇することや<sup>15-17)</sup>、サイクリン D との関連性などが解明されているが<sup>18)</sup>、遺伝子増幅などの変異は認められず、これに関する報告は未だ少ない。これら細胞周期関連因子に異常が生じることによって、また G1/S 期でのこれらの制御異常によって、各種の癌の発生、増殖、進展の生じる可能性がある。同じ消化器系であっても、口腔と胃腸などの癌では、組織型の違いが明瞭であり、また発生部位の違いによって細胞周期関連因子の発現にも特異性のあることが判明している。近年、腫瘍の解明に分子生物学的研究が多用されているが、唾液腺腫瘍についての検索報告はほとんどみられない。

今回、各種の唾液腺腫瘍における増殖機構を探る一助として、癌抑制遺伝子と細胞周期調節因子の発現と局在を免疫組織化学的に検索し、またプロット法によりそれらの mRNA とタンパクの発現を検討した。

### 実験材料と方法

#### I. 免疫組織化学的検索

腺様嚢胞癌24, 粘表皮癌34, 腺癌16, 多形性腺腫20の計94例の唾液腺腫瘍例の手術標本を用いた。手術摘出物は、通法に従い10%中性緩衝ホルマリン固定後、

広島大学歯学部口腔外科学第二講座 (主任: 石川武憲教授) 本論文の要旨は、第51回日本口腔科学会総会 (平成9年4月)、第81回広島大学歯学会例会 (平成9年12月)、第22回頭頸部腫瘍学会 (平成10年6月) において発表した。

パラフィンに包埋した。なお、腺癌については1991年のWHO分類ではさまざまな腺癌が個々に分類され、いずれの腫瘍型にも属さない腺癌がAdenocarcinoma, NOSとして揚げられたが、本研究では、旧分類により組織診断された症例が検索対象となっているため、腺癌に一括して扱った。免疫染色はABC法によって行った。すなわち、組織切片を脱パラフィンし、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-メタノール溶液に浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した後、10分間のマイクロウェーブ処理を3回行い、希釈した血清により非特異的活性を除き、一次抗体を4°Cで一晩反応させ、続いて、希釈ビオチン化二次抗体とABC試薬のいずれについてもVectastain ABC Kit, (Vector, California, USA)を反応させた後、DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride)で発色させ、メチルグリーンで対比染色を行った。そして、癌抑制遺伝子産物に対しては抗p53抗体 (Novocastra Newcastle upon Tyne, UK), 細胞周期関連遺伝子産物に対しては抗p21抗体 (Santa Cruz Bio., INC., CA) および抗p16抗体 (PharMingen San Diego, CA, USA), 細胞周期調節因子に対しては抗サイクリンE抗体 (PharMingen San Diego, CA, USA) および抗サイクリンD1抗体 (Santa Cruz Bio., INC., CA, USA)を用いた。希釈倍率等の条件は表1に示した。なお、陽性反応の判定に当たっては、25%以下の細胞陽性率を+, 25~50%を++, 50%以上を+++とし+++を強陽性として設定した。なお、対照には、正常顎下腺組織20例を用いた。また陽性対照としては胃癌を使用し、陰性対照としては一次抗体を正常マウスIgGに置き換えて染色した。さらに、サイクリンEとD1の発現と、細胞増殖活性との関連を知るため、増殖期のすべての腫瘍細胞が陽性を示す抗Ki-67抗体 (Novocastra Newcastle upon Tyne, UK)による染色を行った(表1)。

## II. ノーザン・ブロット法とウエスタン・ブロット法による検索

唾液腺腫瘍細胞株には当科で樹立した腺様嚢胞癌由来株KSA<sup>19)</sup>、および徳島大学歯学部口腔外科学第二講座佐藤教授より供与された腺癌株HSY<sup>20)</sup>を用いた。各細胞株の培養には、10% FCS (Boehringer Mannheim, Germany)を含んだDulbecco変法Eagle's MEM (ニッスイ製薬, 東京)を用い、37°Cで5% CO<sub>2</sub>-incubator中で継代培養した。また、多形性腺腫2例、腺様嚢胞癌2例、粘表皮癌1例の手術切除材料を、切除直後、迅速に液体窒素中で凍結保存し、被験材料とした。対照には、正常顎下腺2例の新鮮凍結組織を用いた。

### 1. ノーザン・ブロット法

被験材料からRneasy Minikit (QIAGEN, Co., USA)を用いてtotal RNAを抽出した。次いで、10 μgのtotal RNAをホルムアルデヒド法で電気泳動し、ニトロセルロース・メンブレンフィルターに転写した。プローブとして、p53 cDNA<sup>21)</sup> (Cold Spring Harbor 実験室 Harlow 博士供与), p21 cDNA<sup>22)</sup> (Baylor 大学 Noda 博士供与), サイクリンD1 cDNA, サイクリンE cDNA<sup>23)</sup> (Scripps 研究室 Reed 博士供与)を<sup>32</sup>Pで標識し、ハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、X線フィルム上でオートラジオグラフィーを行った<sup>24)</sup>。

### 2. ウエスタン・ブロット法

被験材料から、NP-40を含む緩衝液を用いてタンパクを抽出した<sup>25)</sup>。次いで、50 μgのタンパクを還元化状態でSDS-ポリアクリルアミドゲル上に展開し、ニトロセルロース・メンブレンフィルターに転写した。一次抗体として、抗p53抗体、抗p21抗体、抗サイクリンE抗体および抗サイクリンD1抗体を希釈し表2のごとき条件下に作用させた。免疫複合体の検出にはECL KIT (Amersham, Aylesbury, UK)を用い、X線フィルムに感光させた。

表1 免疫染色に用いた一次抗体

抗体	抗体名 (希釈倍率)
抗ヒト p53 抗体	DO-7, Novo Castra (1/200)
抗ヒト p21 抗体	187, Santa Cruz (1/200)
抗ヒト p16 抗体*	15126E, PharMingen (1/100)
抗ヒトサイクリン E 抗体	14591A, PharMingen (1/50)
抗ヒトサイクリン D1 抗体	HD-11, Santa Cruz (1/200)
抗ヒト Ki67 抗原抗体	MIB-1, Novocastra (1/70)

\* ポリクローナル抗体  
他はモノクローナル抗体

表2 ウェスタン・ブロットに用いた一次抗体

抗体	抗体名 (希釈倍率)
抗ヒト p53 抗体	DO-7, Novo Castra (1/500)
抗ヒト p21 抗体	187, Santa Cruz (1/1000)
抗ヒトサイクリン E 抗体	14591A, Pharmingen (1/500)
抗ヒトサイクリン D1 抗体	HD-11, Santa Cruz (1/750)

いずれもモノクローナル抗体

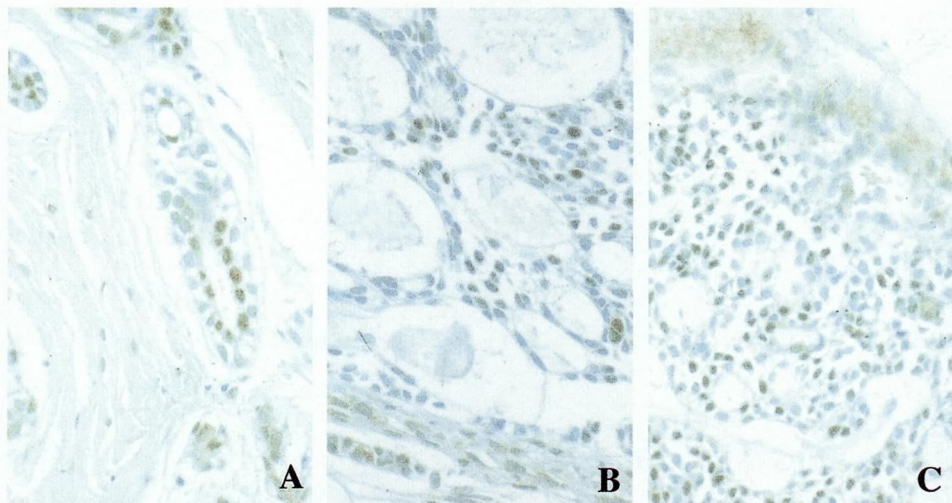


図1 腺様嚢胞癌における p53 の発現.

A. 導管部

導管裏装細胞は陽性を示し, 外側細胞は陰性。(ABC 法,  $\times 150$ )

B. 篩状部

偽嚢胞形成細胞は陰性で, 偽嚢胞間の腫瘍細胞には陽性所見が散見。(ABC 法,  $\times 150$ )

C. 充実性増殖部

腫瘍細胞は陽性。(ABC 法,  $\times 100$ )

## 結 果

### I. 免疫組織化学的検索結果

#### 1. p53 の発現様相

多形性腺腫では, いずれの例にも p53 の発現は認められなかった。

腺様嚢胞癌では, 24例中 3例 (12.5%) に p53 免疫活性を認めた (図1)。部位別にみると, 管腔の裏装細胞, 管腔の外側細胞, 偽嚢胞腔形成細胞, 偽嚢胞間の腫瘍細胞, および充実性増殖部では, 24例中各 3例 (12.5%), 0例 (0%), 0例 (0%), 1例 (4.2%), および 3例 (12.5%) に陽性所見を認めた (図2, 表3)。各症例ごとに20視野を任意抽出して鏡検し, 陽性所見の得られた視野の発現頻度は, 上記部位別に各 4.4, 0, 0, 1.3, および4.4%であった。

粘表皮癌では34例中 8例 (23.5%) に p53 の発現がみ

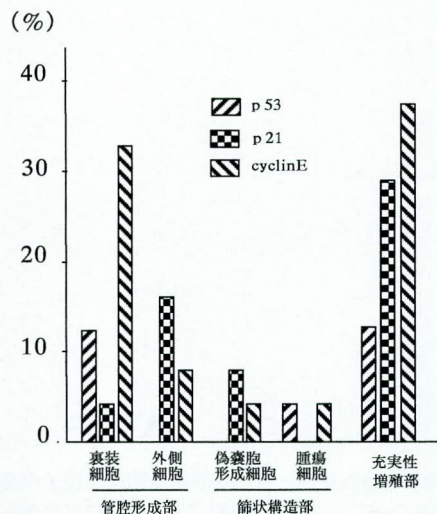


図2 腺様嚢胞癌における細胞周期関連因子の発現頻度.

表3 腺様嚢胞癌の症例および構成細胞における細胞周期関連因子の発現様相

因子 検索部位	p53	p21	Cyclin E
陽性症例	3/24 (12.5)	7/24 (29.2)	10/24 (41.7)
嚢装細胞 導管	3/24 (12.5) (-) (+) (++) (+++) 21/24 0/24 2/24 1/24	1/24 (4.2) (-) (+) (++) (+++) 23/24 0/24 1/24 0/24	8/24 (33.3) (-) (+) (++) (+++) 16/24 0/24 3/24 5/24
	外側細胞	4/24 (16.7) (-) (+) (++) (+++) 20/24 1/24 2/24 1/24	2/24 (8.3) (-) (+) (++) (+++) 22/24 1/24 1/24 0/24
偽嚢胞 形成細胞 篩状部	0/24 (0)	2/24 (8.3) (-) (+) (++) (+++) 22/24 1/24 1/24 0/24	1/24 (4.2) (-) (+) (++) (+++) 23/24 0/24 1/24 0/24
	腫瘍細胞	1/24 (4.2) (-) (+) (++) (+++) 23/24 0/24 1/24 0/24	0/24 (0)
充実性増殖部	3/24 (12.5) (-) (+) (++) (+++) 21/24 1/24 1/24 1/24	7/24 (29.2) (-) (+) (++) (+++) 17/24 2/24 4/24 1/24	9/24 (37.5) (-) (+) (++) (+++) 15/24 0/24 4/24 5/24

- : 発現なし + : 25%以下 ++ : 25~50% +++ : 50%以上の細胞で陽性  
( ) 内は%

られ (図3-A), 粘液産生細胞, 類表皮細胞および中間細胞のそれぞれで, 34例中7例 (20.6%), 6例 (17.6%), および2例 (5.9%) に発現していた (図4, 表4)。

腺癌では16例中5例 (31.3%) に p53 活性が検出された (図5-A, 表5)。各症例ごとに20視野を任意抽出して鏡検し, 陽性所見の得られた視野の発現頻度は

12.2%であった。

2. p21の発現様相

多形性腺腫では, 20例中10例 (50%) に p21 の発現を認めた (図6)。部位別に検索すると, 腺腔形成部, 充実性増殖部および粘液腫様部がいずれも50%の症例で p21 の発現を示した (表6)。軟骨様部には発現は認

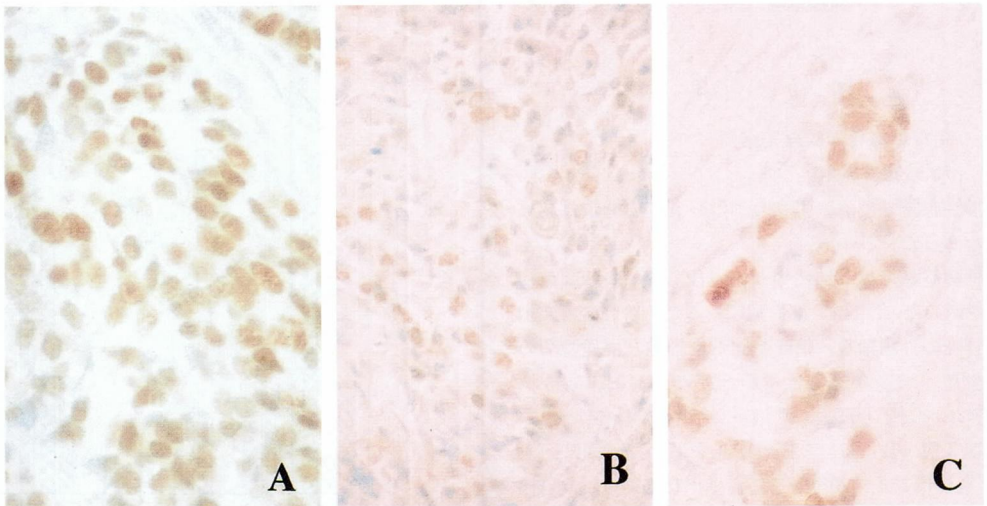


図3 粘表皮癌における細胞周期関連因子の発現。

A : p53, B : p21と C : サイクリン E で, いずれも陽性を示した。(ABC法, A : ×150, B : ×150, C : ×150)



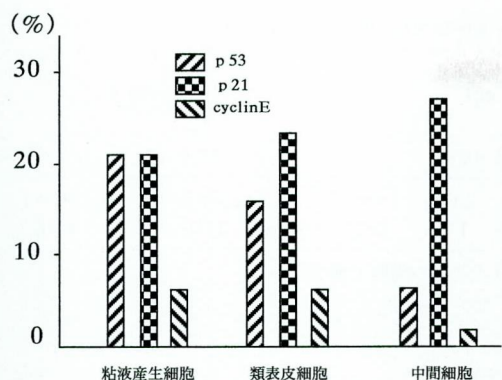


図4 粘表皮癌における細胞周期関連因子の発現頻度.

められなかった。各症例ごとに20視野を任意抽出して鏡検したところ、陽性所見の得られた視野の発現頻度は、上記部位別に各20.3、19.5および18.3%であった。

腺様嚢胞癌では、24例中7例(29.2%)にp21が発現していた(図7)。部位別にみると、管腔の裏装細胞、管腔の外側細胞、偽嚢胞腔形成細胞、偽嚢胞間の腫瘍細胞、および充実性増殖部のそれぞれで、24例中1例(4.2%)、4例(16.7%)、2例(8.3%)、0例(0%)、および7例(29.2%)の症例にp21が発現していた(図2、表3)。各症例ごとに20視野を任意抽出して鏡検し、陽性所見の得られた視野の発現頻度は、上記部位別に各0.8、4.4、2.1、0、および10.2%であった。

表4 粘表皮癌の症例および構成細胞における細胞周期関連因子の発現様相

因子	p53	p21	Cyclin E
陽性症例	8/34 (23.5)	16/34 (47.1)	2/34 (5.9)
粘液産生細胞	7/34 (20.6) (-) (+) (++) (+++) 27/34 3/34 3/34 1/34	7/34 (20.6) (-) (+) (++) (+++) 27/34 3/34 2/34 2/34	2/34 (5.9) (-) (+) (++) (+++) 32/34 1/34 1/34 0/34
類表皮細胞	6/34 (17.6) (-) (+) (++) (+++) 28/34 3/34 3/34 0/34	8/34 (23.5) (-) (+) (++) (+++) 26/34 2/34 4/34 2/34	2/34 (5.9) (-) (+) (++) (+++) 32/34 1/34 1/34 0/34
中間細胞	2/34 (5.9) (-) (+) (++) (+++) 32/34 0/34 2/34 0/34	9/34 (26.5) (-) (+) (++) (+++) 25/34 2/34 5/34 2/34	1/34 (2.9) (-) (+) (++) (+++) 33/34 0/34 1/34 0/34

- : 発現なし + : 25%以下 ++ : 25~50% +++ : 50%以上の細胞で陽性  
( ) 内は%

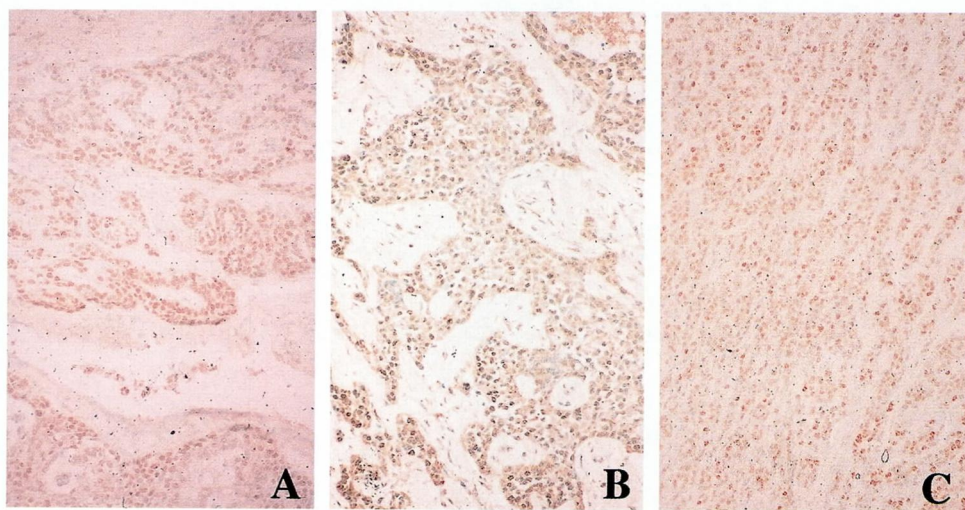


図5 腺癌における細胞周期関連因子の発現.

A : p53, B : p21とC : サイクリン E で、いずれも陽性を示した。(ABC法, A : ×70, B : ×100, C : ×70)

表5 腺癌の症例および構成細胞における細胞周期関連因子の発現様相

因子 検索部位	p53				p21				Cyclin E			
陽性症例	5/16 (31.3)				7/16 (43.8)				5/16 (31.3)			
構成細胞	(-) 11/16	(+) 1/16	(++) 3/16	(+++)	(-) 9/16	(+) 6/16	(++) 1/16	(+++)	(-) 11/16	(+) 1/16	(++) 0/16	(+++)

- : 発現なし + : 25%以下 ++ : 25~50% +++ : 50%以上の細胞で陽性  
( ) 内は%

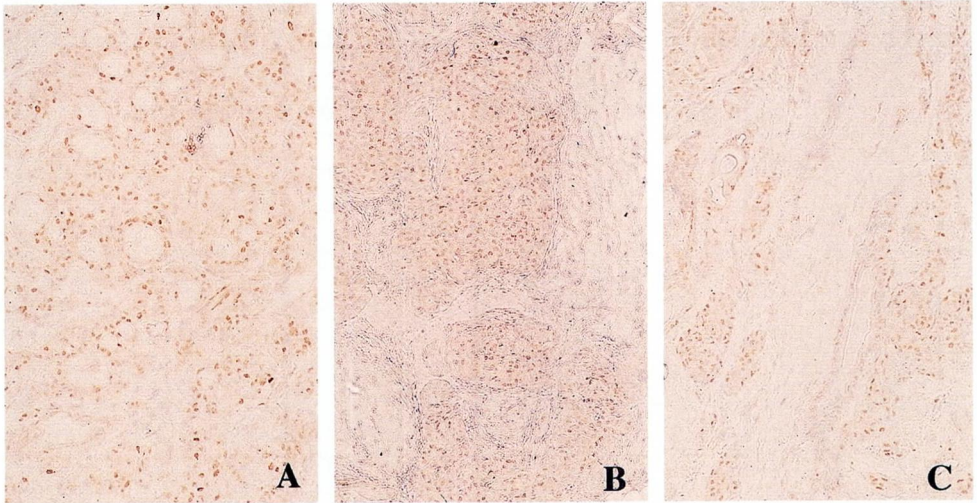


図6 多形性腺腫における p 21 の発現。  
A : 腺腔形成部, B : 充実性増殖部, C : 粘液腫瘍部で陽性を示すが, C の軟骨様部は陰性。(ABC 法, A : ×80, B : ×60, C : ×80)

表6 多形性腺腫の症例および構成細胞における細胞周期関連因子の発現様相

因子 検索部位	p53	p21				Cyclin E			
陽性症例	0/20 (0)	10/20 (50)				11/20 (55)			
腺腔形成部	0/20 (0)	(-) 10/20	(+) 1/20	(++) 6/20	(+++)	(-) 9/20	(+) 5/20	(++) 3/20	(+++)
充実性増殖部	0/20 (0)	(-) 10/20	(+) 2/20	(++) 6/20	(+++)	(-) 9/20	(+) 5/20	(++) 4/20	(+++)
粘液腫瘍部	0/20 (0)	(-) 10/20	(+) 4/20	(++) 5/20	(+++)	(-) 14/20	(+) 3/20	(++) 3/20	(+++)
軟骨様部	0/6 (0)	0/6 (0)				0/6 (0)			
正常唾液腺	0/20 (0)	13/20 (65)				0/20 (0)			

- : 発現なし + : 25%以下 ++ : 25~50% +++ : 50%以上の細胞で陽性  
( ) 内は%



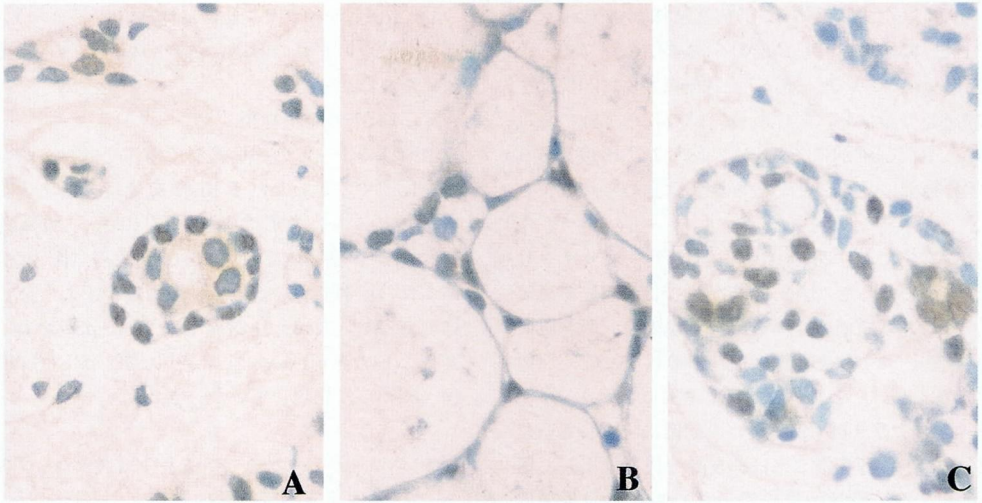


図7 腺様嚢胞癌における p21 の発現.

A. 導管部

導管裏装細胞は陰性。導管の外側細胞は陽性。(ABC法,  $\times 200$ )

B. 篩状部

偽嚢胞形成細胞は陽性。(ABC法,  $\times 200$ )

C. 充実性増殖部

腫瘍細胞は陽性。(ABC法,  $\times 200$ )

粘表皮癌では、34例中16例(47.1%)に p21 が発現していた(図3-B)。粘液産生細胞、類表皮細胞および中間細胞においては、34例中7例(20.6%)、8例(23.5%)、および9例(26.5%)の症例に発現していた(図4、表4)。

腺癌では16例中7例(43.8%)が p21 の活性を示した

(図5-B、表5)。各症例ごとに20視野を任意抽出して鏡検し、陽性所見の得られた視野の発現頻度は8.8%であった。

### 3. サイクリンEの発現様相

多形性腺腫では、20例中11例(55%)がサイクリンEの発現を示した(図8)。部位別に検索すると、腺腔

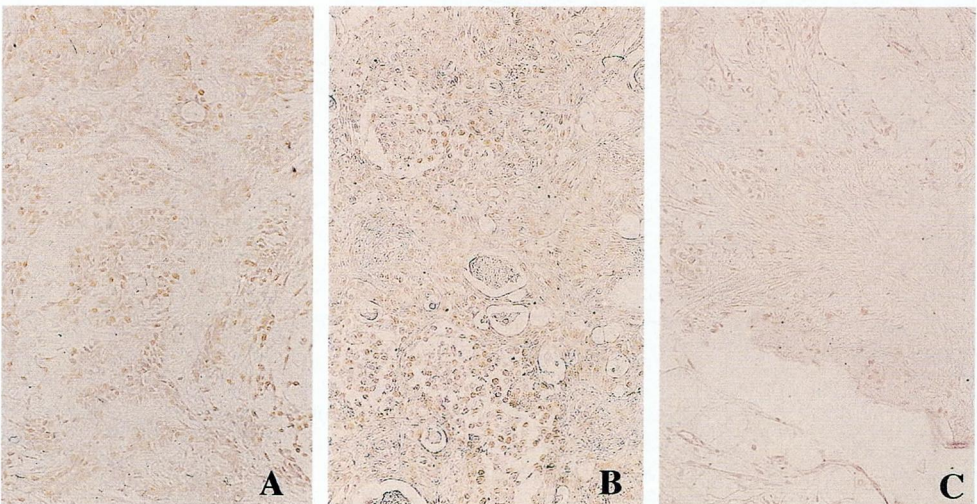


図8 多形性腺腫におけるサイクリンEの発現.

A: 腺腔形成部, B: 充実性増殖部, C: 粘液腫瘍部で陽性を示すが, Cの軟骨様部は陰性。(ABC法, A:  $\times 80$ , B:  $\times 60$ , C:  $\times 80$ )

形成部、充実性増殖部および粘液腫様部のそれぞれが、11例 (55%)、11例 (55%)、および6例 (30%) の症例で発現していた (表6)。各症例ごとに20視野を任意抽出して鏡検し、陽性所見の得られた視野の発現頻度は、上記部位別に各30.3、25.8および10%であった。軟骨様部にサイクリンEの発現は認められなかった。

腺様嚢胞癌では、24例中10例 (41.7%) にサイクリンEが発現していた (図9)。部位別では、管腔の裏装細胞、管腔の外側細胞、偽嚢胞腔形成細胞、偽嚢胞間の腫瘍細胞、および充実性増殖部のそれぞれで、24例中8例 (33.3%)、2例 (8.3%)、1例 (4.2%)、1例 (4.2%)、および9例 (37.5%) の症例に発現していた (図2、表3)。各症例ごとに20視野を任意抽出して鏡検したところ、陽性所見の得られた視野の発現頻度は、各14、2.3、1.0、1.5、および16.7%の率であった。

粘表皮癌では34例中2例 (5.9%) にサイクリンEの発現を認めた (図3-C)。粘液産生細胞、類表皮細胞および中間細胞においてはそれぞれが、34例中2例 (5.9%)、2例 (5.9%)、および1例 (2.9%) の症例で発現していた (図4、表4)。

腺癌では16例中5例 (31.3%) がサイクリンEの活性を示した (図5-C、表5)。各症例ごとに20視野を任意抽出して鏡検し、陽性所見の得られた視野の発現頻度は16.6%であった。

#### 4. p16とサイクリンD1の発現様相

検索したいずれの腫瘍においても、これらの発現は認められなかった。

#### 5. Ki-67の発現様相

増殖期のすべての腫瘍細胞で陽性を示し、かつ増殖能を反映するといわれる Ki-67 を免疫組織化学的に検索したところ、多形性腺腫 (図10-A)、腺様嚢胞癌 (図10-B)、粘表皮癌 (図10-C)、腺癌 (図10-D) のいずれの症例でも、その発現様相はサイクリンEと同様であった。なお、正常顎下腺では、p53 およびサイクリンEの発現はみられなかったが、p21は20例中13例 (65%) に発現していた (表6)。

## II. ノーザン・プロット法とウエスタン・プロット法による検索結果

ノーザンプロット法 (図11)、ウエスタンプロット法 (図12) による検索の結果、対照に比較して、p53、p21、サイクリンD1 および E のいずれについても mRNA およびタンパクの過剰発現は認められなかった。

## 考 察

p53 は、1979年に腫瘍ウイルスのタンパク質と結合する細胞内タンパクとして発見され、'80年代には、腫瘍の増殖を促進する癌遺伝子の1つと考えられていた。しかし、1989年にはさまざまな悪性腫瘍において p53

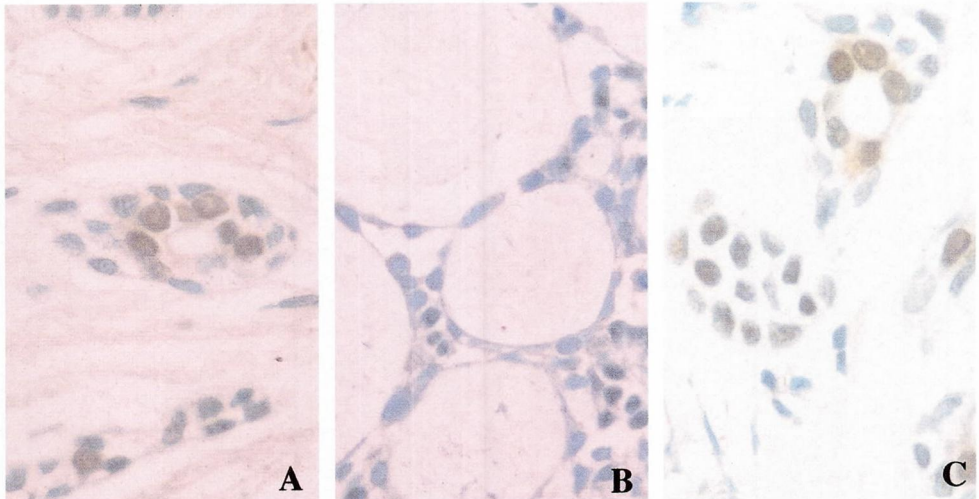


図9 腺様嚢胞癌におけるサイクリンEの発現。

- A. 導管部  
導管裏装細胞は陽性。(ABC法, ×150)
- B. 篩状部  
偽嚢胞間の腫瘍細胞は陽性。(ABC法, ×150)
- C. 充実性増殖部  
腫瘍細胞は陽性。(ABC法, ×100)



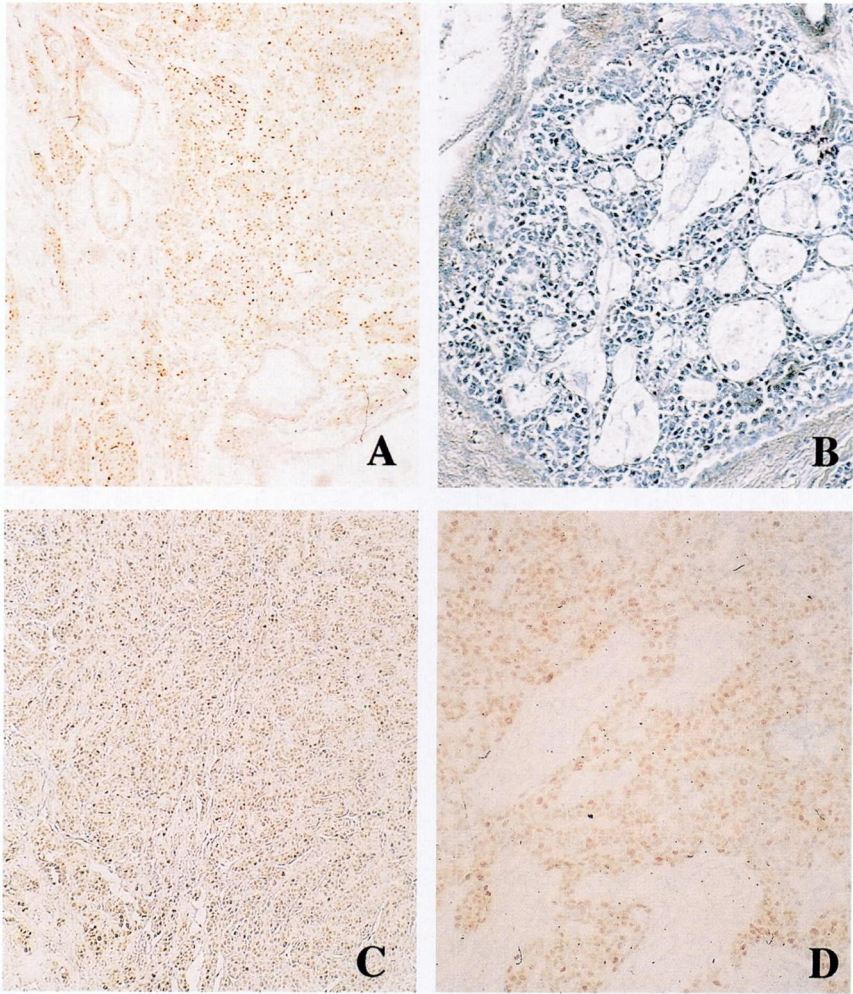


図10 唾液腺腫瘍における Ki-67 の発現様相。

A：多形性腺腫，B：腺様嚢胞癌，C：粘表皮癌およびD：腺癌で，いずれの腫瘍も陽性を示した。  
(ABC法，A：×80，B：×80，C：×80，C：×60)

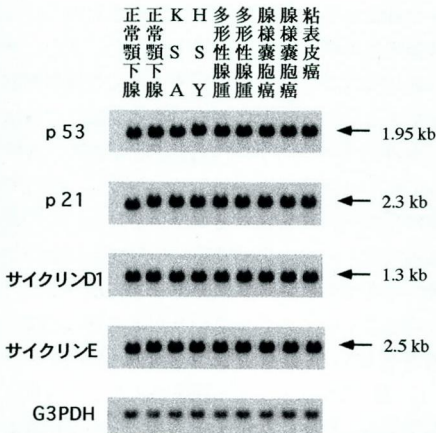


図11 唾液腺腫瘍における細胞周期関連因子のノーザン・プロットによる発現。

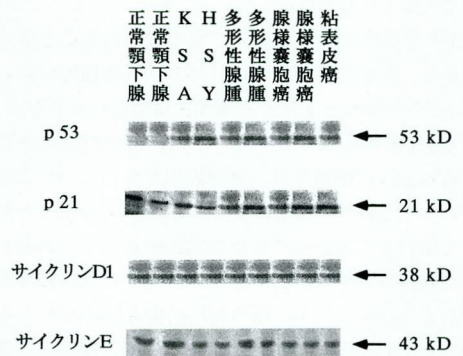


図12 唾液腺腫瘍における細胞周期関連因子のウエスタン・プロットによる発現。

遺伝子が、点突然変異や欠失を示すことが明らかにされ、癌抑制遺伝子の代表的マーカーとして、さまざまな研究に多用されるようになった。変異型 p53 遺伝子産物は野生型遺伝子産物に比べ、半減期が延長し安定化するために、悪性腫瘍細胞の核内に異常蓄積することから<sup>26,27)</sup>、さまざまな腫瘍でその発現が報告されている。胃癌<sup>28)</sup>、大腸癌<sup>29,30)</sup> および頭頸部扁平上皮癌<sup>31)</sup> では、50%以上の例に p53 の異常が生じている。しかし、唾液腺腫瘍における p53 の発現に関する報告は未だ少ないのが現状である。一般的に、唾液腺腫瘍における p53 の発現率は他臓器の悪性腫瘍に比較して低いとされている。腺様嚢胞癌においては 0~18.5%、粘表皮癌では 0~25%<sup>32-34)</sup>、腺癌では 33.3%<sup>33)</sup> の発現が報告されているが、一方で、腺様嚢胞癌では 80%、粘表皮癌では 40% に発現したとの報告もある<sup>35)</sup>。本研究で得られた p53 の発現率は、腺様嚢胞癌で 12.5%、粘表皮癌で 23.5%、腺癌で 31.3% であり、文ら<sup>33)</sup> や新谷ら<sup>34)</sup> の報告に近い結果を示し、他臓器の腫瘍に比べて低い率であった。腺様嚢胞癌を構成成分別に検索すると、腺上皮が関与している管腔裏装細胞には p53 の発現が強く、腫瘍性筋上皮が関与している管腔外側細胞および偽嚢胞形成細胞部には p53 の発現は認められなかった。このことから腺様嚢胞癌では、同一腫瘍内でありながら、構成細胞によって p53 の発現に差があり、このことが、他臓器の悪性腫瘍と比べて、比較的緩慢な増殖をしたり、逆に急激な増殖をきたすなど、予後が異なることに関連する可能性が考えられた。また、腫瘍性筋上皮の関与している部位で p53 の発現が低かったことから、この部位の増殖には変異型 p53 以外の系が関与していることが推定された。予後との関連について、乳癌で p53 タンパクの発現との相関を認めたとの報告もあるが<sup>36,37)</sup>、他の腫瘍においては、その点は解明されていない。今回の検索で、腺様嚢胞癌の篩状部における p53 の発現率が低かったが、篩状型が充実型よりも悪性度が低いといわれていることから、p53 の発現率と予後との間に関連性のあることがうかがえた。しかし腺様嚢胞癌以外の唾液腺腫瘍においては、p53 の発現と予後との関連性は認められなかった。

CDK 抑制遺伝子である p21 は、癌抑制遺伝子産物である p53 に誘導され、細胞周期を負の方向に調節していることが知られている<sup>38)</sup>。また、DNA 損傷の修復にも関わることから、新たな癌抑制遺伝子である可能性が期待されたが、p21 ノックアウトマウスには異常があまり認められず、癌の発生頻度も低いこと<sup>39)</sup> などから、p21 と発癌との関連はまだ明確ではない。乳癌では、癌の進行度と p21 の発現率は逆相関しており<sup>40)</sup>、一般的に正常組織に発現し、悪性度が上がるにつれ発

現は低下するとされている。今回の検索では、多形性腺腫で 50%、腺様嚢胞癌で 29.2%、粘表皮癌では 47.1%、腺癌では 43.8% の発現率が得られ、他臓器の腫瘍と同様に悪性度が増すにつれて発現率は低下し、悪性度と逆相関傾向がみられたことから、p21 発現の低下が唾液腺腫瘍の悪性度を反映している可能性がうかがわれた。多形性腺腫、粘表皮癌においては、部位別に p21 の発現差はみられなかったが、腺様嚢胞癌では、p53 の所見とは逆に、腫瘍性筋上皮が関与しているとされる管腔外側細胞および偽嚢胞形成細胞に高い発現率を示した。すなわち腺様嚢胞癌では、変異型 p53 と p21 とが逆相関する傾向がみられた。

サイクリン E は、細胞周期を正の方向に制御する重要な因子の一つであり、その過剰発現が G1 期を短縮することからも、G1/S 移行期に働く G1 サイクリンであると考えられている<sup>9,41)</sup>。サイクリン E の異常発現は、細胞の異常な増殖と形質転換を惹起すると考えられ、いくつかの癌にサイクリン E の発現異常と遺伝子増幅のあることが報告されている<sup>13,16-18)</sup>。腺腫より腺癌でより発現率が高いという報告もあり<sup>42)</sup>、一般にサイクリン E は、悪性化につれて発現率の上昇することが知られている。今回の検索では、サイクリン E の発現症例は、多形性腺腫で 55%、腺様嚢胞癌で 41.7%、粘表皮癌で 5.9%、腺癌で 31.3% と、多形性腺腫に最も高い発現率を認めた。多形性腺腫は、多彩な組織像を示し、とりわけ間葉様部は腫瘍性筋上皮細胞の変化による特徴的な構造と考えられているが、その発生機序は十分明らかにされてない。サイクリン E の異常発現が細胞の異常な増殖と形質転換を惹起するとすれば、あるいは多形性腺腫の特異な組織構築にはサイクリン E が関与しているかもしれない。しかし、多形性腺腫では細胞発現率 50% 未満の弱陽性例が多いのに対し、悪性唾液腺腫瘍では強陽性例の発現率が高く、その点では他臓器の癌と同様の結果を示した。また、サイクリン E の発現部位は、増殖期のすべての腫瘍細胞で陽性を示すといわれている Ki-67 の発現部位とほぼ合致しており、サイクリン E の過剰発現が癌の増殖に関わっている可能性が推測された。しかし、悪性唾液腺腫瘍に分類される粘表皮癌でのサイクリン E の発現率は極めて低く、また構成細胞別にみても旺盛な増殖力を持つと考えられる中間細胞で最も発現率が低く、細胞の増殖力とサイクリン E の発現との間に相関性はみい出されなかった。周期的に発現するサイクリン E は、G1 期に発現し、G1/S 期を頂点として S 期に入ると消失する。サイクリン E 依存性キナーゼ活性も周期的で、G1 後期から S 期初期にかけてみられるなど、その活性のみられる時期が関係する。したがって、今



後、唾液腺腫瘍細胞の培養株を用い、G1期に同調させた *in vitro* での細胞における検索が必要である。サイクリン E, Ki-67 の発現率と構成細胞の形態的变化の関係を検索すると (図13, 14), 充実性増殖を示し、または母組織の機能を保持している可能性の高い部位では、サイクリン E と Ki-67 の発現率が高く、一方、多形性腺腫の軟骨様部、腺様嚢胞癌の篩状構造部、粘表皮癌の粘液産生細胞のごとく腫瘍性分化により形態的

に化生をきたしている考えられる部位では、これらの発現の低い傾向がみられ、現在提言されている各腫瘍の組織発生の点からも興味ある結果と考えられた。以上の発想は、当科石川の行った多形性腺腫と腺様嚢胞癌の培養細胞所見から得られたもので、筋上皮由来細胞は異常な過剰分泌を呈し、*in vitro* でも篩状構造を構築することが可能であることから、腫瘍細胞の分化に伴って増殖力にも差のあることが推定されている。

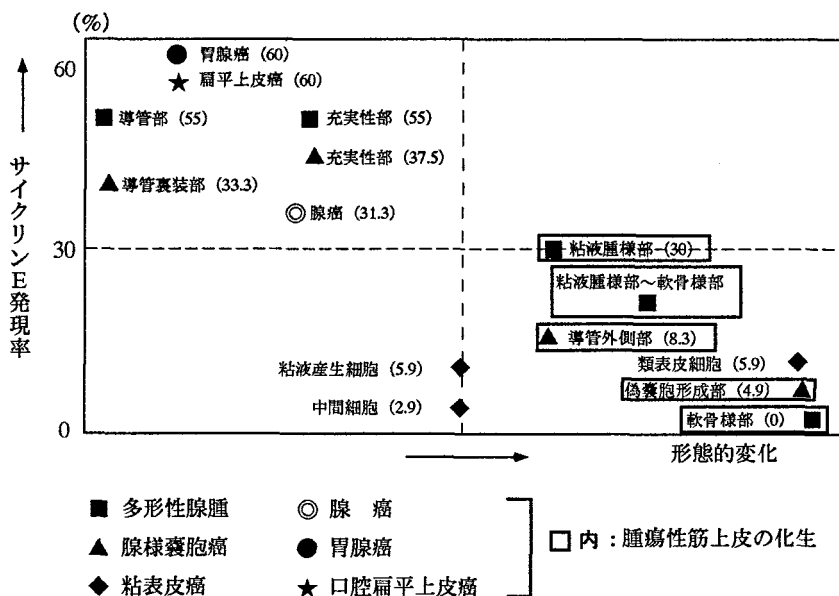


図13 サイクリン E の発現率と組織形態的变化の関係。

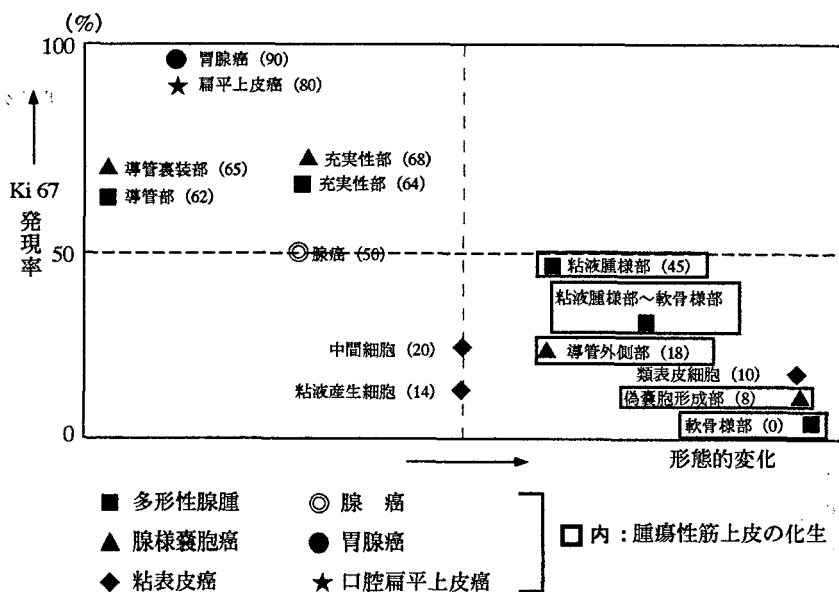


図14 Ki-67 の発現率と組織形態的变化の関係。

p16 遺伝子産物は、CDK の中でも CDK4 と CDK6 のみに結合し、サイクリン D/CDK4 や CDK6 の複合体を解離することにより、Rb タンパクの不活化を抑制していると考えられている<sup>43)</sup>。p16 は、発見当初ヒトの癌組織では p53 よりも高頻度に異常が見いだされると報告され注目されたが、その後、他の研究グループから否定的な結果が報告され、未だ決定的な結論をみていない。今回、検索した唾液腺腫瘍はいずれも p16 の発現を示さなかったが、症例数が少なかったことから、今後さらに検討する必要がある。

哺乳動物細胞の G1/S 移行期に働く G1 サイクリンには、サイクリン D と E が深く関与することが知られている。細胞増殖の脱制御を惹起し、発癌に関与すると考えられるサイクリンについて、サイクリン D の遺伝子増幅や過剰発現がみられる扁平上皮癌と異なり、胃癌ではサイクリン E に遺伝子増幅や過剰発現がみられる。また、CDK 抑制遺伝子である p15 と p16 についても、扁平上皮癌を含む多くの腫瘍由来の培養株で遺伝子の欠失や点突然変異が高頻度に認められるが、胃癌ではそれらの頻度は低いことなどから、サイクリンには臓器・組織特異性のあることがうかがわれる。既に、当科で行った検索でも、同じ消化管癌であっても、胃癌ではサイクリン E、頭頸部扁平上皮癌ではサイクリン D が癌の発生、増殖および進展により強く関与している可能性が示唆された<sup>44,45)</sup>。今回の検索で、p16、サイクリン D1 の発現が認められなかったことから、唾液腺腫瘍での G1 サイクリンには、他の腺系腫瘍と同様にサイクリン D よりもサイクリン E が強く関与しており、腺系組織としての臓器特異性を示していると考えられる。

ノーザンおよびウエスタン・プロット法による検索では、p53、p21、サイクリン D1 およびサイクリン E タンパクの発現は認められたが、正常唾液腺組織と比べてそれらの mRNA の過剰発現はみられなかった。しかし、当科で行った検索や他施設からの報告では、やはり腺系腫瘍である胃癌や大腸癌では、これらの mRNA に増幅が認められている。唾液腺腫瘍は多彩な組織像を示し、腫瘍の構成細胞も二相性を示す点で他臓器の腺系腫瘍と比較して特異的である。本検索では、唾液腺腫瘍でのこれら因子のタンパクの発現率が低く、腫瘍の組織型や部位によって発現率に差があり、均一な腫瘍細胞により構成される他臓器の腫瘍にはみられない結果を示した。すなわち、唾液腺腫瘍の場合、腫瘍組織を一単位として検索する手法では正常組織との発現差が認知しにくいといえる。mRNA レベルでは増幅などの異常はなく、タンパクレベルの機能の異常によって、正常組織と異なった代謝異常が起

り、その結果、細胞内でタンパクが異常蓄積し、今回のごとき結果をもたらしたのかもしれない。いずれにしても、多彩な組織像を特徴とする唾液腺腫瘍では、症例数を増やすとともに、*in situ hybridization* などによって mRNA の組織内分布を詳細に再検索する必要がある。

p53 とサイクリン E の発現に関してみると、p53 は、CDK/サイクリンと結合して活性を阻害する作用を有する p21 のプロモーターに結合して、その転写能を活性化することが判明している。すなわち、p53 は p21 を介して CDK/サイクリン活性を阻害することにより、細胞周期の進行を止めていると考えられている。p53 に変異のある胃癌細胞株では、p21 は極めて低いレベルで発現し、p53 異常蓄積を示す大多数の胃癌細胞は、免疫組織学的にも、サイクリン E を発現していることが既に報告されている<sup>44,45)</sup>。本検索でも、p53 とサイクリン E の発現様相はほぼ同様の傾向を示したのに対し、p21 の発現にはこれらと逆相関を示す傾向がみられ、胃癌と同様の結果を示した。このことから、p53 の異常により p21 が抑制され、そのため唾液腺腫瘍においてもサイクリン E の過剰発現が誘導される可能性が推定される。また、p53 とサイクリン E の発現する腺様嚢胞癌では、比較的予後の良い篩状型でそれらの発現率が低く、サイクリン E は Ki-67 の発現部位とほぼ一致し、その癌の増殖・進展への関与や予後との関連性が注目される。しかし、検索した範囲ではそのような相関性はみられなかった。この結果は、唾液腺腫瘍の増殖・進展機序には、p53、p21、サイクリン E 以外の因子が関与していることを示唆しているかもしれない。

以上の所見から、悪性唾液腺腫瘍にはサイクリン D1 は発現せず、他の腺系腫瘍と同様にサイクリン E が細胞増殖に働くことが強く考えられた。しかし、他臓器の腺癌に比べ、p53 やサイクリン E の発現が低いことから、他臓器の腺癌細胞と悪性唾液腺腫瘍における構成細胞の増殖機序には違いのある可能性が考えられ、また、唾液腺腫瘍を構成する腺上皮と筋上皮のそれぞれ関与する部分で、p53 とサイクリン E に発現差があることから、これらの細胞の増殖機序にも差異のあることが推定された。

## 結 論

- I. 94例の唾液腺腫瘍における癌抑制遺伝子 p53 および細胞周期関連因子 p21、サイクリン E の発現を免疫組織化学的に検索し、他臓器腫瘍で報告されているこれら各因子の発現率と比較した。
1. p53 陽性症例の発現率は、腺様嚢胞癌、粘表皮癌



と腺癌で、各12.5、23.5と31.3%であり、胃癌や口腔扁平上皮癌に比較して低値であった。多形性腺腫には発現がみられなかった。

2. p21は、多形性腺腫、腺様嚢胞癌、粘表皮癌および腺癌で、各50、29.2、47.1および43.8%の症例に発現し、胃癌、口腔扁平上皮癌に比較して低値であった。

3. サイクリンEは、多形性腺腫、腺様嚢胞癌、粘表皮癌と腺癌において、各55、41.7、5.9と31.5%の症例に発現し、それぞれ胃癌、口腔扁平上皮癌に比較して低値であった。

## II. 唾液腺腫瘍の構成細胞別にみた各因子の免疫組織化学的発現状況は、以下のごとくであった。

1. 多形性腺腫では、p21およびサイクリンEは、腺腔形成部でそれぞれ50と55%、充実性増殖部で50と55%、粘液腫様部で50と30%の症例に発現していたが、軟骨様部ではいずれの発現もみられなかった。

2. 腺様嚢胞癌では、p53、p21およびサイクリンEは、腺腔裏装部でそれぞれ12.5、4.2と33.3%、導管外側部で0、16.7と8.3%、偽嚢胞形成部で0、8.3と4.2%、充実性増殖部で12.5、29.2と37.5%の症例に発現を示し、構成細胞別にみたこれらの発現頻度には差異がみられた。

3. 粘表皮癌では、p53、p21およびサイクリンEは、粘液産生細胞でそれぞれ20.6、20.6、5.9%、類表皮細胞で17.6、23.5、5.9%、中間細胞で5.9、26.5、2.9%の症例に発現し、いずれの因子の発現にも構成細胞による差はほとんどみられなかった。

## III. ノーザン・プロット法とウエスタン・プロット法による検索により、唾液腺腫瘍では、正常唾液腺組織に比較して、p53、p21、サイクリンD1、サイクリンEのmRNAおよびタンパクのいずれにも過剰発現はみられなかった。

以上の結果から、悪性唾液腺腫瘍にはサイクリンD1は発現せず、他臓器の腺系腫瘍と同様にサイクリンEが細胞増殖に働くことが強く示唆された。また、二相性構造を示す唾液腺腫瘍では、充実性増殖部や腺上皮部にサイクリンEの陽性率が高く、筋上皮系細胞が偽嚢胞形成や間葉様構造への変化を示す部位に低い傾向がうかがわれた。とくに腺様嚢胞癌では、同一腫瘍内でも構成細胞によってp53やサイクリンEに発現差があり、他臓器の悪性腫瘍と比べて本腫瘍が比較的緩慢な増殖をしたり、逆に急激な増殖をきたすなど、予後の違いに関連する可能性が考えられた。また、腫瘍性筋上皮の関与する部位の増殖には、変異型p53以外の系が関与していることが推測された。腺様嚢胞癌の篩

状型は充実型よりも悪性度が低いと一般にいわれているが、篩状部におけるp53の発現率が低かったことから、p53の発現率と本腫瘍の予後との間に関連性のあることが推測された。なお、腺様嚢胞癌以外の唾液腺腫瘍においてはp53の発現と予後との関連性は認められなかった。また、増殖期細胞に陽性を示すKi-67の発現は、どの唾液腺腫瘍でもサイクリンE発現の部位とはほぼ一致していた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に御指導および御校閲を賜りました本学口腔外科学第二講座石川武憲教授に深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究と本論文作成に、始終御教示、御指導戴いた本学口腔病理学講座二階宏昌教授ならびに口腔生化学講座加藤幸夫教授に深甚なる感謝の意を表します。

さらに、本研究を遂行する上で御指導戴いた本学口腔外科学第二講座原田直講師に心より感謝の意を表しますとともに、多大な御支援を戴いた杉山勝助教授ならびに同講座の諸先生方に感謝します。

## 文 献

- 1) 二階宏昌, 小川郁子, 高田 隆: 唾液腺腫瘍の免疫組織化学—腫瘍性筋上皮の染色所見を中心にW病理と臨床. 7, 574-581, 1989.
- 2) 二階宏昌, 岡邊治男: 歯学生のための病理学; 口腔病理編. 1版, 医歯薬出版, 東京, 252-264, 1991. より引用.
- 3) Gallo, O. and Bani, D.: *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 120, 675, 1994.
- 4) Baker, J.M., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F. and Nakamura Y.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinoma. *Science* 244, 217-221, 1989.
- 5) Soong, R., Robbins, P.D., Dix, B.R., Grieu, F., Lim, B., Knowles, S., Williams, K.E., Turbett, G.R., House, A.K. and Iacopetta, B.J.: Concordance between p53 protein over expression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Human Pathol.* 27, 1050-1055, 1996.
- 6) Ikeguchi, M., Saito, H., Katano, K., Tsujitani, S., Maeta, M. and Kaibara, N.: Expression of p53 and p21 are independent prognostic factors in patients with serosal invasion by gastric carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* 43, 964-970, 1998.
- 7) Rey, M.J., Fernandez, P.L., Jares, P., Munoz, M., Nadal, A., Peiro, N., Nayach, I., Mallofre, C., Muntane, J., Campo, E., Estape, J. and Cardesa,

- A: p21WAF1/Cip1 is associated with cyclin D1CCND1 expression and tubular differentiation but is independent of p53 overexpression in human breast carcinoma. *J. Pathol.* **184**, 265–271, 1998.
- 8) Dublin, E.A., Patel, N.K., Gillett, C.E., Smith, P., Peters, G. and Barnes, D.M.: Retinoblastoma and p16 proteins in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histopathological parameters. *Int. J. Cancer* **79**, 71–75, 1998.
  - 9) Sherr, C.J.: G1 phase progression.cycling on cue. *Cell* **79**, 515–555, 1994.
  - 10) Hunter, T. and Pines, J.: Cyclins and cancer II. cyclin D and cdk inhibitors come of age. *Cell* **79**, 573–582, 1994.
  - 11) Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D.: D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**, 505–514, 1992.
  - 12) 松七五三 仁: 哺乳動物細胞におけるサイクリン D 依存性蛋白質リン酸化酵素活性. *医学のあゆみ* **171**, 302–305, 1994.
  - 13) Williams, M.E., Gaffey, M.J., Weiss, L.M., Wilczynski, S.P., Schuurin, E. and Levine, P.A.: Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **119**, 1238–1243, 1993.
  - 14) Callender, T., el-Naggar, A.K., Lee, M.S., Luna, M.A., Frankenthaler, R. and Batsakis, J.G.: PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* **74**, 152–158, 1994.
  - 15) Sakaguchi, T., Watanabe, A., Sawada, H., Yamada, Y., Yamashita, J., Matsuda, M., Nakajima, M., Miwa, T., Hirao, T. and Nakano, H.: Prognostic value of cyclin E and p53 expression in gastric carcinoma. *Cancer* **82**, 1238–1243, 1998.
  - 16) Furihata, M., Ohtsuki, Y., Sonobe, H., Shuin, T., Yamamoto, A., Terao, N. and Kuwahara, M.: Prognostic significance of cyclin E and p53 protein overexpression in carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Br. J. Cancer* **77**, 783–788, 1998.
  - 17) Sasaki, H., Ishizuka, T., Igaki, H. and Terada, M.: Mutation frequency of the p16/CDKN2 gene and amplification of the cyclin E gene in human primary gastric carcinomas. *Nippon Rinsho* **54**, 1049–1053, 1996.
  - 18) Anayama, T., Furihata, M., Ishikawa, T., Ohtsuki, Y. and Ogoshi, S.: Positive correlation between p27<sup>Kip1</sup> expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **79**, 439–443, 1998.
  - 19) Ikemoto, K., Murakami, K., Yasui, A., Ishikawa, T. and Shimosato, T.: Biological properties of newly-established cell line (KSA) from human adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Tissue Culture in Dentistry* **26**, 41–43, 1989.
  - 20) Yasunaga, T., Hayashi, Y., Nagamine, S., Yoshida, H., Yura, Y. and Sato, M.: Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonals cells grown in athmic nude mice. *Virchows Archiv B* **51**, 187–195, 1986.
  - 21) Harlow, E., Williamson, N.M., Ralston, R., Helfman, D.M. and Adams, T.E.: Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1601–1610, 1985.
  - 22) Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R.: Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* **211**, 90–98, 1994.
  - 23) Lew, D.J., Dulic, V. and Reed, S.I.: Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (cln) function in yeast. *Cell* **66**, 1197–1206, 1991.
  - 24) Yoshida, K., Yokozaki, H., Niimoto, M., Ito, H., Ito, M. and Tahara, E.: Expression of TGF- $\beta$  and procollagen type I and type III in human gastric carcinomas. *Int. J. Cancer* **44**, 394–398, 1989.
  - 25) Yasui, W., Ayhan, A., Kitadai, Y., Nishimura, K., Tokozaki, H., Ito, H. and Tahara, E.: Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas. *Int. J. Cancer* **43**, 36–41, 1993.
  - 26) Rodrigues, N.R., Rowan, A., Smith, M.E., Kerr, I.B., Bodmer, W.F., Gannon, J.V., Lane, D.P., Gannon, J.V. and Greaves, R.: p53 mutations in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 7555–7559, 1990.
  - 27) Gannon, J.V., Greaves, R., Iggo, R. and Lane, D.P.: Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO. J.* **9**, 1595–1602, 1990.
  - 28) Martin, H.M., Filipe, M.I., Morris, R.W., Lane, D.P. and Silvestre, F.: p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* **50**, 859–862, 1992.
  - 29) Kawasaki, Y., Monden, T., Morimoto, H., Murotani, M., Miyoshi, Y., Kobayashi, T., Shimano, T. and Mori, T.: Immunohistochemical study of p53 expression in microwave-fixed, paraffin-embedded sections of colorectal carcinoma and adenoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **97**, 244–249, 1992.
  - 30) Purdie, C.A., O'Grady, J., Piris, J., Wyllie, A.H. and Bird, C.C.: p53 expression in colorectal tumors. *Am. J. Pathol.* **138**, 807–813, 1991.
  - 31) Field, J.K., Spandidos, D.A., Malliri, A., Gosney, J.R., Yiagnisis, M. and Stell, P.M.: Elevated P53 expression correlates with a history of heavy



- smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br. J. Cancer* **64**, 573-577, 1991.
- 32) Soini, Y., Kamel, D., Nuorva, K., Lane, D. P., Vahakangas, K. and Paakko, P.: Low p53 protein expression in salivary gland tumours compared with lung carcinomas. *Virchows. Arch. A* **421**, 415-420, 1992.
- 33) 文 樹民, 辻 龍雄, 木村由香, 伊田正道, 佐々木功典, 篠崎文彦: 悪性唾液腺腫瘍における p53 蛋白の免疫組織化学的発現と病理組織学的因子との関連性について. *日口外誌* **40**, 495-500, 1994.
- 34) 新谷 悟, 松村智弘, 坂井義春: 口腔領域悪性腫瘍における癌抑制遺伝子産物 p53 の免疫組織化学的検索. *日口外誌* **38**, 1274-1279, 1992.
- 35) 櫻井一成, 浦出雅裕, 植松邦夫, 八十嶋仁, 山田章彦, 堀 和敏, 高橋由美子, 岸本裕充, 大久保恵理子, 柳澤高道: 癌の臨床 **43**, 884-888, 1997.
- 36) Ostrowski, J.L., Sawan, A., Henry, L., Wright, C., Henry, J.A., Hennessy, C., Lennard, T.J., Angus, B. and Horne, C.H.: p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. *J. Pathol.* **164**, 75-81, 1991.
- 37) Kaczmarek, L., Oren, M. and Baserga, R.: Co-operation between the p53 protein tumor antigen and platelet-poor plasma in the induction of cellular DNA synthesis. *Exp. Cell. Res.* **162**, 268-272, 1986.
- 38) el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* **75**, 817-825, 1993.
- 39) Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Leder, P.: Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675-684, 1995.
- 40) Caff, O., Doglioni, C. and Veronese, S.: Prognostic value of p21<sup>WAF1</sup> and p53 expression in breast carcinoma: An immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. *Clin. Cancer Res.* **2**, 1591-1599, 1996.
- 41) Heichman, k.A. and Roberts, J.M.: Rules to replicate by. *Cell* **79**, 557-562, 1994.
- 42) Yasui, W., Kuniyasu, H., Yokozaki, H., Semba, S., Shimamoto, F. and Tahara, E.: Expression of cyclin E in colorectal adenomas and adenocarcinomas: correlation with expression of Ki-67 antigen and p53 protein. *Virchows. Arch. A* **429**, 13-19, 1996.
- 43) Serrano, M., Hannon, J.H. and Beach, D.: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704-707, 1993.
- 44) Akama, Y., Yasui, W., Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Kitahara, K., Ishikawa, T. and Tahara, E.: Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **86**, 617-621, 1995.
- 45) Yasui, W., Akama, Y., Kuniyasu, H., Yokozaki, H., Semba, S., Shimamoto, F. and Tahara, E.: Expression of cyclin E in human gastric adenomas and adenocarcinomas: correlation with proliferative activity and p53 status. *J. Exp. Therap. Oncol.* **1**, 88-94, 1996.